

536-103

AU 151 48810

J6 3243101
OCT 1988

<p>88-327830/46 B04 D16 J04 S03 IATR 30.03.87 IATRON LABORATORIES *J6 3243-101-A</p> <p>30.03.87-JP-074550 (11.10.88) C08b-37/16 G01n-33/52</p> <p>Cyclodextrin deriv. covalently-bound with basic functional gp.. . promotes colouring of nitrophenol deriv. In visible light region and is used in enzyme activity determinn.</p> <p>C88-144949</p>	<p>B(4-B2C, 4-C2B1, 11-C7B1, 12-K4A) D(5-A2, 6-H2) J(4-B1B)</p> <p>light region and is useful for various methods of determining activity of enzyme by using synthetic substrate bound with nitrophenol deriv.. (6pp Dwg.No.0/1)</p>
<p>A cyclodextrin deriv. covalent-bound with basic functional gp.. is claimed.</p> <p>Basic functional gp. has structured formula (I), where R₁ and R₂ = H or 1-8C lower alkyl group, n = 1-8. In the colouring method using the dextrin deriv. bound with basic functional gp., nitrophenol deriv. is included in the cyclodextrin deriv. and colouring is caused by adding the cyclodextrin deriv. in a reaction system forming nitrophenol deriv.. Colouring of nitrophenol deriv. is carried out in neutral to weakly acidic condition. Gp. of formula (I) is e.g. diethylaminoethyl gp., dimethylaminopropyl gp., aminoethyl gp., etc. The cyclodextrin deriv. bound with basic functional gp. has much higher solubility to water than cyclodextrin, and the inclusion cpd. of nitrophenol deriv. with the cyclodextrin deriv. bound with basic functional gp. can be easily dissolved in water, consequently high colouring effect to nitrophenol deriv. can be obtd. in neutral or weak acidic state.</p> <p>USE/ADVANTAGE - The cyclodextrin deriv. bound with basic functional gp. promotes colouring of nitrophenol deriv. in visible</p>	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \\ \text{N}-\text{CH}_2-\overbrace{\text{---}}^{\text{n}} \\ \\ \text{R}_2 \end{array} \quad (\text{I})$

© 1988 DERWENT PUBLICATIONS LTD.
 128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England
 US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101
Unauthorised copying of this abstract not permitted.

⑪ 公開特許公報 (A)

昭63-243101

⑤Int.Cl.

C 08 B 37/16
G 01 N 33/52

識別記号

厅内整理番号

6779-4C
A-8305-2G

④公開 昭和63年(1988)10月11日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑥発明の名称

シクロデキストリン誘導体及び発色方法

⑦特 願 昭62-74550

⑧出 願 昭62(1987)3月30日

⑨発明者	八木 達彦	静岡県静岡市北1664番地の33
⑨発明者	久田 隆基	静岡県静岡市下島615番地の72
⑨発明者	尾形 真理	静岡県静岡市大谷836 静大宿舎336
⑨発明者	柴田 秀人	千葉県四街道市千代田1-29-15
⑨発明者	鷲本 三利	千葉県八千代市大和田新田469-428
⑨発明者	大沢 力	千葉県船橋市習志野台1-8-20 コーポすばる202
⑩出願人	株式会社 ヤトロン	東京都千代田区東神田1丁目11番4号
⑪代理人	弁理士 山下 積平	

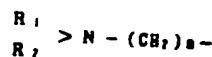
明細書

1. 発明の名称

シクロデキストリン誘導体及び発色方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 基性官能基を共有結合させたシクロデキストリン誘導体。
- (2) 基性官能基が下記式で表されるものである特許請求の範囲第1項記載の化合物。



(式中、R₁、R₂はそれぞれ炭素数1~3個の低級アルキル基もしくは、水素を示し、nは1~3の整数を表わす。)

(3) 基性官能基を共有結合させたシクロデキストリン誘導体を用いて、ニトロフェノール誘導体を包被するすることを特徴とする発色方法。

(4) ニトロフェノール誘導体を生成する反応系に、上記誘導体を共有させ発色を行わせるところの特許請求の範囲第3項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は塩基性官能基で修飾されたシクロデキストリンに関するもので、合成基質を用いた測定法等に応用され、臨床化学検査等の分野において効果的に用いられる。更に本発明はニトロフェノール類を中性ないし弱酸性条件下で発色させるための其要及び方法に関するものである。

〔従来の技術〕

ニトロフェノール類の1種である4-ニトロフェノール(バラニトロフェノールともいう)は4-ニトロフェノール基をもつる種合成基質が特定の酵素作用により分解されるときに生成する物質で、この物質の増加を経時的に定量することにより当該酵素の活性を容易に測定することができる。例えば、フェヌファターゼの活性を測定するためには4-ニトロフェノールリン酸を基質として選択して生じる4-ニトロフェノールを定量する。フェヌファジエステラーゼの活性測定にはビス(4-ニトロフェニル)リン酸を基質として用

特開昭63-243101(2)

様に測定する。 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼと β -N-アセチルグルコサミニダーゼの活性測定では、合成基質として4-ニトロフェニル-N-アセチル- β -D-グルコサミニドが利用される。その他、各種のグリコシダーゼ（グリコシド結合の加水分解を触媒する酵素）、ホスホリバーゼC、トリプシンやキモトリプシンなどのセリンプロテアーゼ、D-グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドログナーゼなどに対し、4-ニトロフェニル基をもつ合成基質が開発され、臨床検査をはじめとするさまざまな分野で実用に供されている。

【発明が解決しようとする問題点】

以上の例で示した各種酵素の活性測定が可能となる原理は、例えば4-ニトロフェニル基をもつ合成基質の場合は、その合成基質と離離して生じる4-ニトロフェノールの間で吸光スペクトルに差があるという事実に基盤をおいている。すなわち、4-ニトロフェニル基をもつ合成基質は広いpH領域において紫外部（波長300～320nm）

多く採用されている。すなわち、現行測定法では酵素活性測定法としてより正確で簡便な形式といわれる理想的なレートアッセイが困難なだけでなく、アルカリ添加という余分な操作を必要とする。

中性ないし弱酸性の領域に最適pHをもつ酵素には、例えば酸性ファッターゼ、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼなど臨床化学的に重要な酵素が含まれている。これら酵素の反応を経時的に連続モニターするための有用な手段を得ることができれば、測定操作を簡素化し、測定時間を短縮できるだけでなく、測定精度をも高め、各種疾患の早期発見や診断に正確な情報を提供できる。

従って、4-ニトロフェノール及びその他のニトロフェノール類の中性ないし弱酸性のpH領域での効果的な発色促進作用を有する酵素の開発は、臨床化学検査分野における実用面に重要な課題くなっている。

【問題点を解決するための手段】

に強い吸光ピークをもち可視部（波長400nm以上）にはほとんど吸光を示さないが、4-ニトロフェノールはアルカリ性pH領域において離離し、400nm付近を中心とする強い吸光ピークをもつ4-ニトロフェノレート・アニオンを生じる。したがって、測定しようとする酵素の活性をアルカリ性pH領域で測定できれば、酵素反応の進行とともにう可視部の発色を400nmの吸光度増加として連続モニターでき、正確なレートアッセイが可能となる。しかし、測定しようとする酵素の最適pHが中性ないし弱酸性の領域にあれば、4-ニトロフェノールの吸光スペクトルは4-ニトロフェニル基をもつ合成基質の吸光スペクトルとほとんどオーバーラップしてしまい、発色が競合で、反応を経時に連続モニターすることが著しく不可能となる。そこで、現行の測定法では、酵素反応をスタートさせてから一定時間後に、アルカリを添加して反応を停止させると同時に生成した4-ニトロフェノールを発色させ、その400nm付近の吸光度を測定するという方法が

本発明は、塩基性官能基を共有結合させたシクロデキストリン誘導体である。

更に本発明は、塩基性官能基を共有結合させたシクロデキストリン誘導体を用いて、ニトロフェノール誘導体を包被するすることを特徴とする発色方法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

4-ニトロフェノールをはじめとする芳香族化合物は、極水的性質をもつフェニル基がシクロデキストリンに取り込まれて包被化合物を形成することが知られている。これにより芳香環のイオン状態に微妙な変化が起きれば電離の促進が期待される。そこで、4-ニトロフェノール等にローシクロデキストリンまたはローシクロデキストリンを添加すると電離が進行し、400nm付近の吸光度の増大がみられるが、その効果は中性から特に弱酸性領域ではなお満足できるものではなくそれ自体の溶解性の低さも合わせ、実用化には多くの問題を含んでいる。

本発明者等は、臨床検査の結果、シクロデキス

トリンに
り、フェ
いかど
ル類の
こで出人
導体をイ
ニトロ
ル類の
ろ、即
達成し
本免
性官能
び、下
結合体
 C_2H_5
 C_2H_5
 $NaOH$
 $C_2H_5 >$
 C_2H_5
同様

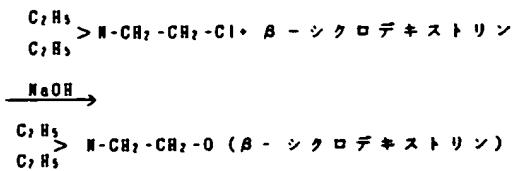
活性の
素反応
は向る
ーゼと
エニ
ル）一
場合、
前解
い。
はた
他に
でこ
るも
り
作り
ま
ニ
チ

43101(2)

長400nm以上
4-ニトロ
いて電離し、
ピークをもつ
を作り。し
活性をアルカ
反応の進行に
吸光度増加と
トアッセイが
する酵素の最
効領域にあれ
ベクトルは4
の吸光スペク
しまい、発色
ターすること
行の測定法で
ら一定時間後
させると同時
発色させ、そ
ういう方法が

トリルに塩基性官能基を共有結合させることにより、フェノール性水酸基の電離の促進が起こらないかどうか、またそれにより4-ニトロフェノール類の発色促進が起こらないかどうかを試みてそこで塩基性基を結合させたシクロデキストリン誘導体を合成し、中性ないし弱酸性pH領域で、4-ニトロフェノールおよびその他のニトロフェノール類の吸光スペクトルに対する効果を調べたところ、固有な発色効果をもつことが判明し本発明を達成した。

本発明を更に詳述すると本発明のために、塩基性官能基としてまずジエチルアミノエチル基を選び、下記の原理により、そのシクロデキストリン結合体を合成した。



同様にしてα-シクロデキストリンのジエチル

結合させたシク
塩基性官能基を
結合させた
ニトロフェ
を特徴とする発
する芳香族化
基がシクロデ
結合を形成する
芳香環のイオン
の促進が期待さ
ール等にローシ
ロデキストリン
0nm付近の吸光
は中性から弱に
のではなくそれ
用化には多くの
シクロデキス

塩基性のニトロフェノール誘導体が発色剤として酵素反応の経過観察のために結合されている。例えば前記のN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ測定のための合成基質である、4-ニトロフェニル（あるいは2-クロロ-4-ニトロフェニル）-N-アセチル-β-D-グルコサミニドの場合、β-シクロデキストリンの助けで必要量の溶解が試みられるが、シクロデキストリン自身の溶解性の悪さのためその目的を充分に果たし得ない。それに比し、本発明によるDEα、DEβ等はたやすく水に溶解させることができ、その包括能により上記基質等を充分に必要量溶かし得るのでこの点においても本発明に実用的価値を付加するものである。

更に本発明の本質である中性ないしは弱酸性条件下でのニトロフェノール誘導体に対する発色効果を種々の誘導体を用いて調べた。4-ニトロフェノール、2-クロロ-4-ニトロフェノール、5-ニトロサリチル酸、5-ニトロサルチル酸メチル、2,4-ジニトロフェノールなどについて

特開昭63-243101(3)

アミノエチル結合体が得られる。またジエチルアミノエチル基以外にジメチルアミノエチル、ジメチルアミノプロピル、アミノエチル基等の結合体も得ることができる。このように塩基性官能基で修飾されたシクロデキストリン、例えばジエチルアミノエチル化α-シクロデキストリン（以下DEαと略す。）およびジエチルアミノエチル化β-シクロデキストリン（以下DEβと略す。）は意外にも、通常のシクロデキストリンに比べるかに本によく溶け実用に供し易いものであった。現在、特に安価で一般に用いられているα-シクロデキストリンは比較的に水に溶解性でこの性質が臨床化学検査等における実用上の適用を決めているものである。

すなわち、難溶性の目的物質をβ-シクロデキストリンの包被により溶解せしめる時シクロデキストリン自身の溶解性によりその溶解度が限界されてしまうのである。具体的には特定酵素の活性を測定するためによく使用される合成基質の溶解の場合などである。加水分解酵素の場合は多く這

である。显くべきことにこれらの中で最も中性ないしは特に弱酸性下で電離が緩慢な、すなわちpH 5.0付近においては、400nm付近での電離性の可視部発色ピークが認められない4-ニトロフェノールできえ、DEαあるいはDEβの1%以下の通常濃度の存在下でその400nm付近に大きな新しい電離性の発色ピークを出現させ、DEα、DEβの作用とその効果が顯著であることが示された。通常のシクロデキストリンではこれ程の効果は認められない。またDEα、DEβでは水への溶解性がよいため使用量を増やして効率的な増強できる。また他のニトロフェノールについても1%以下の通常濃度で、数倍に及ぶ可視部発色効果が示された。

特に2-クロロ-4-ニトロフェノールは中性ないし弱酸性下で4-ニトロフェノールに比べ、比較的発色がなされ易いものとして、最近それを結合させた特定酵素のための合成基質が供されているが、例えばpH 5.0以下で酵素反応を行う前記のN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ等

については、酸素反応の結果そのpHで生成する2-クロロ-4-ニトロフェノールの400 nm付近における強度発色は、なお、全く不充分で、その生成量を連続モニターできるほどの感度と精度をもたない。しかるに、ここへのDE α 、あるいはDE β の添加は生成する2-クロロ-4-ニトロフェノールの吸収スペクトルをほぼ完全電離に近いかたちに出現せしめ発色させるので、ほぼ理想的な状態での当解液の連続モニター測定が行える。

前記のとおり、DE α 、DE β ないしは充分水に溶け易く、当合成基質の必要量を反応液に溶解できることと合わせ实用面に著しい効果を供するものである。

以上の効果は、同様に、中性付近で反応を行う α -アミラーゼのための合成基質である、4-ニトロフェニル-マルトヘプタオシド、あるいは2-クロロ-4-ニトロフェニル-マルトペントオシド等を用いて生成するニトロフェニル誘導体を400 nm付近で連続モニターする α -アミラーゼ

1.5 gを含む4 mlの水溶液を滴下していくと透明な液が得られる。さらに攪拌を続けるとジエチルアミノエチルクロリド塩酸塩1.4 gを含む2 mlの水溶液を滴下し、30~40℃で数時間攪拌を続けると反応は完全に終結する。この反応混合液より、セファデクスG-25カラムクロマトグラフィーにより低分子物質を除去することにより1.8 gのDE α が得られる。得られたDE α はジエチルアミノエチル基を1個ないし2個共有結合していることが中和測定およびプロトン候補気共鳴より判明した。

2.2-(N,N-ジアルキルアミノエチル)- α -シクロデキストリン(以下、DE β と略記)：上記合成1において α -シクロデキストリンのかわりに β -シクロデキストリンを用いることにより、ほぼ回収率でDE β を合成することができる。

実施例2

DE α の4-ニトロフェノールに対する可視域発色効果と酵素反応への応用。

の測定の場合、あるいは、よりpHの低い領域で酵素反応を行わせる酸性ファスファーゼ測定のためのニトロフェノール誘導体を結合させた合成基質を使用する場合などにおいても、通常のシクロデキストリンに比し、はるかに効率的に使用される。

以上DE α 、DE β について本発明の効果を述べたが他の堿基性官能基を修飾したシクロデキストリン及び他の酵素反応のためニトロフェノール誘導体を結合した他の合成基質を使用する場合においても本発明の本質は、同様である。

【実施例】

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

実施例1

(発色基質の合成法)

1.2-(N,N-ジアルキルアミノエチル)- α -シクロデキストリン(以下、DE α と略記)：
 α -シクロデキストリン2.4 gを4 mlの蒸留水に懸濁させ、攪拌しながら水酸化ナトリウム

第1図はpH 5.0における4-ニトロフェノールの吸光スペクトルと、発色基質としてDE α を濃度1%に添加した場合の吸光スペクトルを比較したものである。この図より明らかのように4-ニトロフェノールは400 nm付近においてほとんど吸光度をもたないが、DE α を含む溶液中で明らかな発色促進効果が示され400 nmにおける吸光度は、4-ニトロフェノールの紫外部吸光度の30%以上に達し、十分に測定可能となる。一方、4-ニトロフェニル合成基質の1つである4-ニトロフェニル-N-アセチル- β -D-グルコサミニドの吸光スペクトルは、pH 5.0における4-ニトロフェニルのスペクトルよりわずかに低波長にシフトしている以外はほとんど同じで、これにDE α を濃度1%に添加しても、吸光ピークの微少な長波長シフトが観察されるだけで400 nm付近における吸光度は全く影響を受けない。したがって、DE α を含むこの反応液中で4-ニトロフェニル-N-アセチル- β -D-グルコサミニドを基質として、N-アセチル- β -D-グル

コサミ
エノ
ニタ
ができ
極大を
する分
する性
度変化
測定塗
であら
可視部
が酸性
pH領域
実施例
DE
発色効
果
実施
いるこ
得るこ
実施を

の変
実施
D
に対
実
いそ
DE
どう
DE
(i)
%ア
い-
は、
な
立
増
(i
の
い
の

3101(4)

い領域で酵
セ測定のた
せた合成基
常のシクロ
に使用され

の効果を述
シクロデキス
フェノール
する場合に

具体的に説明

ル) - α -
(と略記):
4 - 0 の蒸
ナトリウム

フェノール
DEAを酸
ルを比較し
こうに4 -ニ
てほとんど
液中で濃度
うける吸光度
吸光度の30
5。一方、4
である4 -ニ
リーグルコサ
における4 -
らずかに低被
けじで、これ
吸光ピークの
だけで400
受けない。し
やで4 -ニト
-グルコサミ
- D - グル

コサミニダーゼを作用させ生成する4 -ニトロフ
ェノールを410 nmの吸光度変化量として連続モ
ニターすることにより当酵素活性を測定するこ
とができる。なお、DEα共存下で可視部吸光度の
極大を与える波長は410 nmである。また、使用
する分光光度計が360 nmにおける吸光度を測定
する性能をも有していれば、同波長における吸光
度変化をモニターすることによりpH5.0における
測定感度を更に、約25%増大させることも可能
である。DEαの4 -ニトロフェノールに対する
可視部吸光度増大効率はpH4.0においてもいくら
か濃度され、中性ないし最高アルカリ性までの広い
pH領域においてその効果を保持している。

実施例3

DEBの4 -ニトロフェノールに対する可視部
発色効果

実施例1におけるDEαのかわりにDEBを用
いることにより、DEαの約60%の発色効果を
得ることができる。

実施例4

の変化量として連続モニターすることができた。

実施例5

DEαおよびDEBの他のニトロフェノール類
に対する可視部発色効果

実施例2～4の方法でpH5.0において、いろ
いろなニトロフェノール類に対し、DEα及び
DEBが可視部吸光度を増加させる効果をもつか
どうかについて調べた結果を示す。なお、用いた
DEαおよびDEBの濃度は0.1%とした。

(i) 2,4 -ジニトロフェノールはpH5.0で約90
%電離しているから、そのままでも400 nmにお
いて強い吸光を示している。しかし、この吸光
は、紫外部にある強い吸光の肩を形成するにすぎ
ない。ここにDEαを添加すると、400 nmに独立
した吸光ピークを形成し、その吸光度は35%
増大した。

(ii) 5 -ニトロサリチル酸はpH5.0で400 nm
の吸光度は紫外部吸光極大値の2.5%にすぎな
い。これにDEαまたはDEBを添加すると、そ
の吸光度を3ないし4倍に増大させることができ

特開昭63-243101(5)

DEα、DEBの2 -クロロ -4 -ニトロフェ
ノールに対する可視部発色効果と酵素反応への
応用

2 -クロロ -4 -ニトロフェノールは、pH5.0
において10%以上も電離しているので、400
nm付近にも吸収を示す。0.1 M - 水酸継衝液中そ
れぞれ0.8%以上の濃度でDEα、DEBを加え
た時、2 -クロロ -4 -ニトロフェノールの吸収
スペクトルはほぼ完全電離に近いかたちを示し、
400 nmでの吸光度はDEαで3.8倍、DEBで
3.4倍であった。

一方、合成基質のひとつである2 -クロロ -4
-ニトロフェニール -N -アセチル -β -D -グル
コサミニドはpH5.0において400 nm付近には
ほとんど吸収を示さない。DEαあるいはDEBに
おいても微妙な屈折率シフトが観察されるだけで
400 nm付近の処理にはほとんど影響がない。從
って、この基質溶液にN -アセチル -β -D -グル
コサミニダーゼを作用させ、生産する2 -クロ
ロ -4 -ニトロフェノールを410 nmでの吸光度

る。

(iii) 5 -ニトロサリチル酸メチルのpH5.0にお
ける400 nmの吸光度は紫外部吸光極大値の3.8
%である。これにDEBを添加すると400 nmを
中心に新しい吸光ピークが出現し、吸光度は8.4
倍に増大する。DEαはDEBより弱いが類似の
効果をもつ。

(iv) 5 -ニトロサリチル酸エチルに対しても、
DEBおよびDEαはメチルエステルに対するの
と類似の効果を示す。しかし、その効果はメチル
エステルの場合の方が濃度である。

【発明の効果】

以上から明らかに如く、本発明によれば塩基性
官能基を結合したシクロデキストリンは、ニトロ
フェノール弱導体の可視部における発色を著しく
助長する効果を有し、また、更には、それ自身適
當のシクロデキストリンより水に易溶のためニト
ロフェノール弱導体を結合した合成基質を用いる
各種の酵素活性測定法に応用する時、従来にない
実用面での有用性を持つ。

4. 図面の簡単な説明

第1図は4-ニトロフェノールの吸光スペクトルのDE α による影響を示すグラフ図である。

1 … pH5.0 20m μ 硫酸銅液中
□ … DE α 1% を含む pH5.0 20m μ 硫酸銅
液中

第1図

